



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

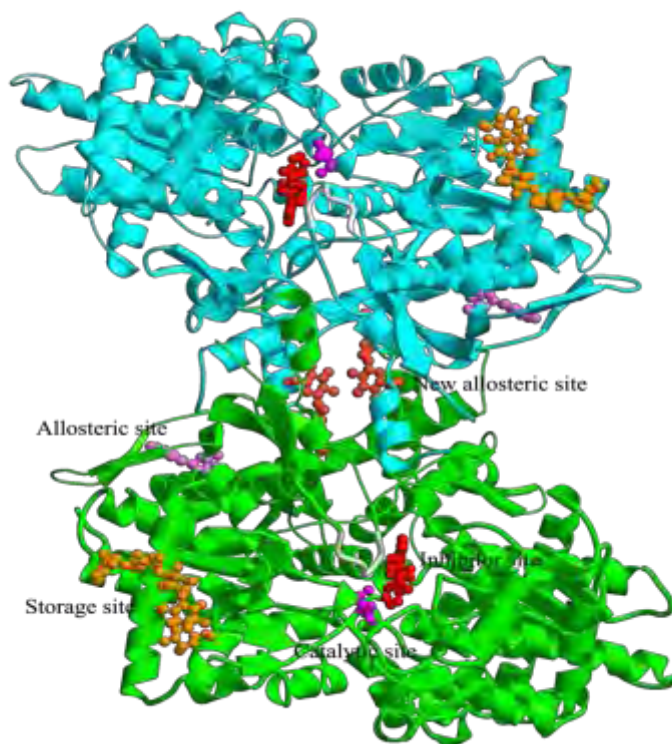
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΛΥΚΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ

ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ



ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ ΑΘΗΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. Δημήτριος Δ. Λεωνίδας**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Δρ. Δημήτριος Κομιώτης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών μορίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Μαρία Κοντού**

Επίκουρος Καθηγητής Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που δέχτηκε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Η προθυμία του να μοιραστεί τις γνώσεις του και την εμπειρία του, η συνεχής βοήθεια και καθοδήγηση καθώς και η υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος υπήρξαν πολύτιμες. Επιπροσθέτως, ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δρ. Κομιώτη Δημήτρη για τα δείγματα των αναστολέων που μου προσέφερε για τη διεξαγωγή του πειράματός μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ, Κοντού Μαρία για την άριστη συνεργασία.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Αναστασία Καντσάδη η οποία παρά τις υποχρεώσεις της στο εργαστήριο, μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Εισαγωγή.....	6
1. Σακχαρώδης διαβήτης.....	6
1.2 Φυσιολογικός ρόλος ινσουλίνης.....	9
1.3.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	11
1.3.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	12
2.1 Γλυκόζη.....	12
2.2.1 Γλυκογόνο.....	15
2.2.2 Σύνθεση γλυκογόνου.....	16
2.2.3 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	17
2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	21
2.3.1 Κρυσταλλική δομή της GP.....	24
2.3.2 Κέντρα σύνδεσης της GP.....	27
3. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	29
Πειραματικό μέρος.....	30
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	30
2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου b.....	34
2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb.....	34
2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....	36
2.3 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα.....	37
2.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb- γλυκογόνου.....	39
2.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος.....	39
2.3.3 Εκτέλεση του πειράματος.....	41
2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου.....	42
2.5 Παρασκευή τυφλών.....	43
2.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit	44
3. Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	47
Αποτελέσματα –Συζήτηση.....	50
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.....	50
2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	51
2.2 Κινητική μελέτη ενώσεων DK 27 και DK 28.....	52
Βιβλιογραφία.....	56

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακός στόχος για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση δύο αναλόγων γλυκόζης με διαφορετικό υποκαστάτη στη θέση 1', η DK27 (βενζοαδενίνη) και η DK28 (αδενίνη) στην ενζυμική του δραστηριότητα. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι οι ενώσεις αυτές είναι αναστολείς μέσης ισχύος του ενζύμου με σταθερές αναστολής, IC_{50} 1.51 ± 0.14 mM και 2.53 ± 0.52 mM αντίστοιχα.

Abstract

Diabetes mellitus, one of the more serious hormonal imbalance diseases is characterised by elevated blood glucose levels. With the aim of treating this pathological state, enzymes and substrates involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets for the rational structure-based design of potential hypoglycaemic drugs. Previous studies have shown that hepatic glycogen phosphorylase represents an important molecular target for the design of new hypoglycaemic drugs. In the present study, glycogen phosphorylase b from rabbit muscle has been employed as molecular target for the kinetic studies of 2 new glucose analogues with different substitutions at the C1' position of the glycopyranose ring, DK27 (benzoadenine) and DK28 (adenine), targeting the catalytic site of the enzyme. The kinetic experiments, performed in the direction of

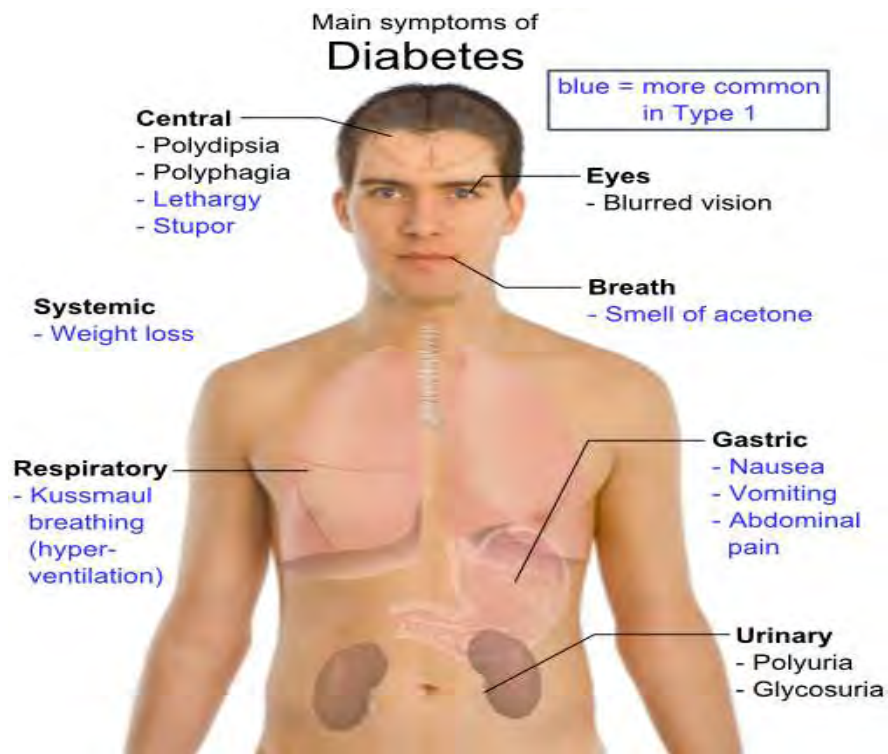
glycogen synthesis, showed that the analogues are medium potency inhibitors of the enzyme with IC_{50} values of 1.51 ± 0.14 mM and 2.53 ± 0.52 mM , respectively.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης, είναι μια χρόνια ασθένεια που προκύπτει είτε επειδή το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή ινσουλίνη, είτε επειδή ο οργανισμός δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει αποτελεσματικά την ινσουλίνη που παράγεται. Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Η κλασική συμπτωματολογία που παρατηρείται στο σακχαρώδη διαβήτη περιλαμβάνει υπεργλυκαιμία, γλυκοζουρία, πολυφαγία, πολυουρία, πολυδιψία και απώλεια βάρους. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι διαβήτη οι οποίοι είναι ο τύπου 1, που είναι αποτέλεσμα αποτυχίας του οργανισμού να παράγει ινσουλίνη και άρα το άτομο θα πρέπει να τη λάβει εξωγενώς (ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης ή αλλιώς νεανικός διαβήτης). Ο διαβήτης τύπου 2, αποτέλεσμα αντίστασης στην ινσουλίνη, κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν σωστά την ινσουλίνη ενώ κάποιες φορές

υπάρχει και έλλειψη ινσουλίνης (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης ή διαβήτης των



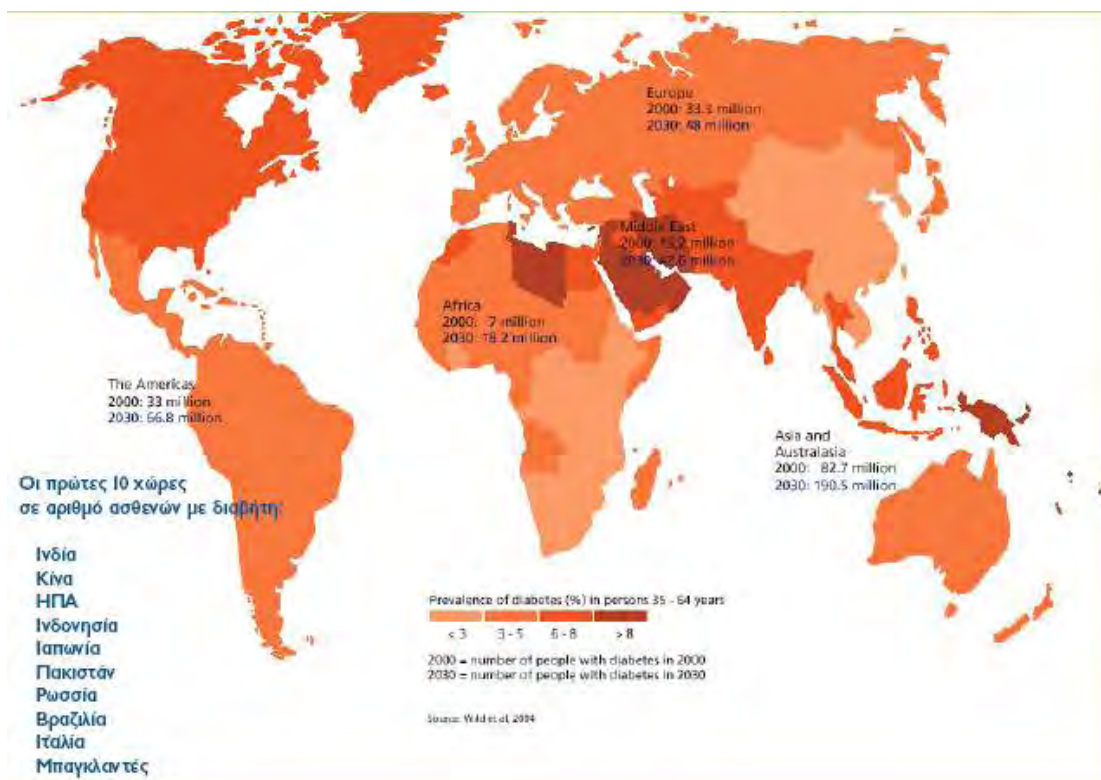
ενηλίκων).

Εικόνα 1: Τα βασικά συμπτώματα σακχαρώδους διαβήτη.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία (IDF) για το διαβήτη 194.000.000 άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333.000.000 το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, τις αλλαγές στον τρόπο ζωής και της καθιστικής ζωής. Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33.300.000 άτομα με διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48.000.000. Ο διαβήτης είναι η τέταρτη αιτία θανάτου στις περισσότερο ανεπτυγμένες χώρες. Πρόσφατα στοιχεία από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας υποδηλώνουν ότι 3,2 εκατ. θάνατοι κάθε χρόνο οφείλονται στον διαβήτη, δηλαδή 6 θάνατοι το λεπτό. Στην Ευρώπη αντίστοιχα 609.000 θάνατοι οφείλονταν στον διαβήτη. <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf>

Στην Ελλάδα εκτός ελέγχου βρίσκεται η έξαρση του σακχαρώδους διαβήτη καθώς πάνω από το 10% του ελληνικού πληθυσμού, δηλαδή 1,2 εκατ. άνθρωποι, πάσχουν από τη νόσο και πολλοί από αυτούς δεν το γνωρίζουν. Ο αριθμός έχει αυξηθεί κατά τέσσερις φορές την τελευταία 30ετία, με την ασθένεια να κάνει πλήττει κυρίως τον πληθυσμό των παχύσαρκων. Ο διαβήτης τύπου 2 έχει στενή σχέση με την παχυσαρκία και συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακών επεισοδίων, νεφρικής ανεπάρκειας, νευροπάθειας, μόνιμων βλαβών του αμφιβληστροειδούς και άλλων σοβαρών επιπλοκών.

<http://www.sugarfree.gr/content/view/1339/50/> Η πιθανότητα ανάπτυξης επιπλοκών λόγω του σακχαρώδους διαβήτη μειώνεται όσο καλύτερα ρυθμίζονται οι τιμές του σακχάρου στο αίμα. Μια σειρά παραγόντων, όπως το κάπνισμα, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, η παχυσαρκία, η αρτηριακή υπέρταση και η καθιστική ζωή, επιταχύνουν την ανάπτυξη επιπλοκών. Οι επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες. Οι οξείες είναι η διαβητική κετοξέωση και το διαβητικό κώμα, υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα και η υπογλυκαιμία (επιπλοκή της θεραπείας). Οι χρόνιες είναι η διαβητική μικροαγγειοπάθεια και διαβητική μακροαγγειοπάθεια (αρτηριοσκλήρυνση, στεφανιαία νόσος).

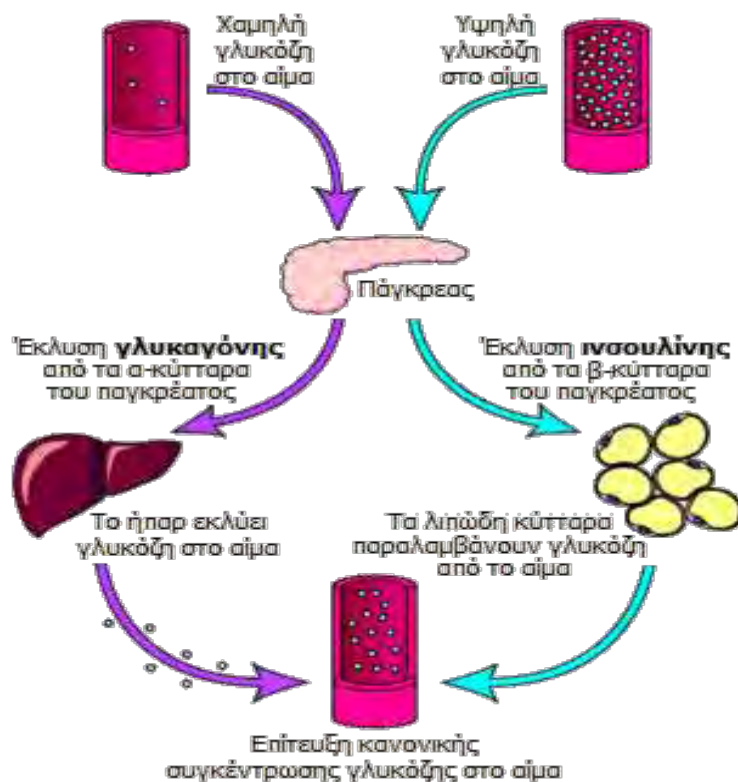


Εικόνα 2: Η διασπορά των ασθενών με διαβήτη παγκοσμίως. [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας, <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf>].

1.2 Ο βιολογικός ρόλος της ινσουλίνης

Η **ινσουλίνη** και η **γλυκαγόνη** (glucagon) είναι δύο πολυπεπτιδικές ορμόνες οι οποίες εκκρίνονται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος από το πάγκρεας (ενδοκρινείς ορμόνες). Με τις ορμόνες αυτές ρυθμίζεται η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσον όρο πρέπει να παραμένει σταθερή σε μια στενή περιοχή (70 mg/dL έως 110 mg/dL). Και οι δύο ορμόνες παράγονται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και έχουν ακριβώς αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα. Ένα αρκετά απλουστευμένο σχήμα που δείχνει τον κεντρικό ρόλο του παγκρέατος στη ρύθμιση της γλυκόζης παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.

Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. Τα β-κύτταρα "διεγείρονται" από τα μόρια γλυκόζης και η δράση της είναι ξεκάθαρα αναβολική. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης. Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του

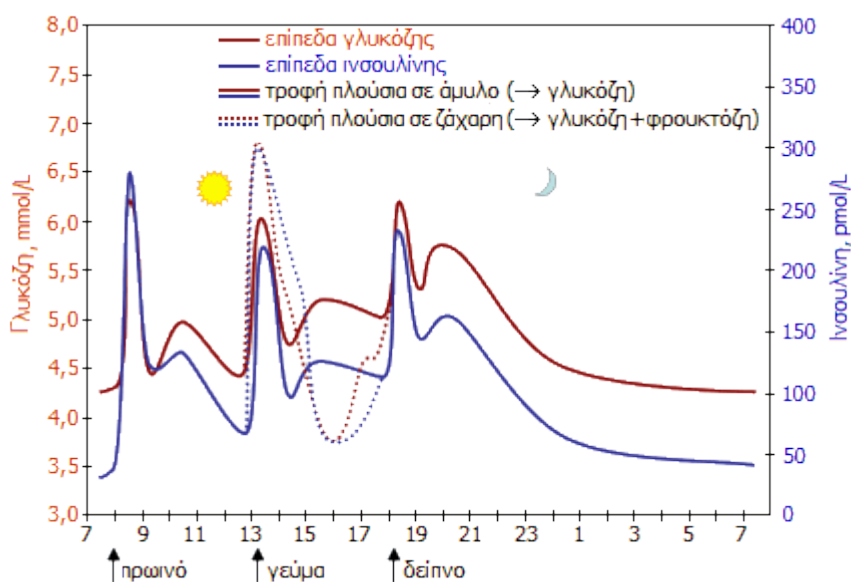


οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα (adipocytes). Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν

γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη

Εικόνα 3: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι αυξημένη στο αίμα, απελευθερώνεται από το πάγκρεας ινσουλίνη που κατευθύνεται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη προκαλεί σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα. Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης που λαμβάνεται από το πάγκρεας και το ήπαρ. Στο ήπαρ η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Η γλυκόζη μεταφέρεται στο αίμα και αυξάνει την συγκέντρωση του σακχάρου.

μορφή γλυκογόνου (glycogen). Εάν το ήπαρ "κορεσθεί" σε γλυκογόνο, η γλυκόζη αρχίζει να κατευθύνεται στα λιπώδη κύτταρα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη "καθοδηγεί" τα κύτταρα, όταν αυτά αναζητούν ενέργεια, να καταναλώσουν γλυκόζη αντί λιπαρών οξέων και επομένως εμπλέκεται στους μηχανισμούς συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Πέραν της εμπλοκής της ινσουλίνης στο ισοζύγιο σακχάρου/λίπους, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (όπως π.χ. σε καταστάσεις νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 4: Διακύμανση των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης κατά τη διάρκεια των γευμάτων.

Η **γλυκαγόνη** εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και η δράση της είναι ξεκάθαρα **καταβολική**. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυική δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη στάθμη γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά το αποταμιευμένο στο ήπαρ (κυρίως) και στους μύες προς γλυκόζη. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στους λιπώδεις ιστούς με αποτέλεσμα την αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία.

Οι δράσεις της γλυκόζης στο μεταβολισμό είναι: (1) Έλεγχος της πρόσληψης ορισμένων ουσιών και κυρίως της γλυκόζης από τους μυικούς και τους λιπώδεις ιστούς. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών αντιγραφής του DNA και της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω ελέγχου της πρόσληψης αμινοξέων. (3) Τροποποίηση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων.

Η δράση της στα κύτταρα περιλαμβάνει: (1) Ενίσχυση του μηχανισμού σύνθεσης γλυκογόνου και αποθήκευσής του. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών σύνθεσης λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων στα λιπαρά κύτταρα. (3) Περιορίζει τη διάσπαση των πρωτεϊνών. (4) Περιορίζει τον σχηματισμό γλυκόζης από μη υδατανθρακικά μόρια. (5) Περιορίζει τις βλάβες που υφίστανται οργανίδια των κυττάρων. (6) Βελτιώνει την πρόσληψη αμινοξέων. (7) Βοηθά στην πρόσληψη καλίου από τα κύτταρα και έτσι μειώνει τη συγκέντρωσή του στο αίμα. (8) Χαλαρώνει τον μυικό τόνο, αυξάνει τη ροή αίματος ιδιαίτερα μέσω των μικροαρτηριών. (9) Βοηθά στην έκκριση υδροχλωρικού οξέος από τα επιθηλιακά καλυπτήρια κύτταρα (parietal cell) του στομάχου. http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_insulin.htm

1.3.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή ινσουλινο-εξαρτώμενος (IDDM)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 προκαλείται από αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος. Η έναρξη της αυτοάνοσης προσβολής συμβαίνει πολλά χρόνια πριν την εμφανιζόμενη ανεπάρκεια στην έκκριση ινσουλίνης και μέχρι τη χρονική στιγμή που θα διαδνωσθεί ο σακχαρώδης διαβήτης, τα β κύτταρα έχουν υποστεί ανεπανόρθωτη πλέον βλάβη. Το γεγονός αυτό παρατηρείται συνήθως σε ηλικία μικρότερη των 30 ετών, λόγος για τον οποίο του αποδόθηκε η παλαιότερη περιγραφή ως σακχαρώδης διαβήτης «πρώιμου έναρξης». Το πρωτεύον εύρημα σε

αυτό το διαβητικό σύνδρομο, αποτελεί η αδυναμία έκκρισης ακόμη και των μέτριων εκείνων ποσών ινσουλίνης, που απαιτούνται για καταστολή του σχηματισμού κετόνης, κατάσταση που προκαλεί επαναλαμβανόμενα επεισόδια κετοξέωσης. Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 συνήθως εμφανίζονται απότομα και εξελίσσονται γρήγορα, συχνά η πρώτη εκδήλωσή του μπορεί να είναι η ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης, με ναυτία,εμετούς, διάχυτο κοιλιακό άλγος και απώλεια συνείδησης.

1.3.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 ή μη ινσουλινο-εξαρτώμενος (NIDDM)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 συνιστά τη δεύτερη κύρια μορφή του σακχαρώδη διαβήτη. Οι πάσχοντες από διαβήτη τύπου 2 αποτελούν το 90-95% του πληθυσμού των διαβητικών. Κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγάλη ηλικία και εκτιμάται ότι από διαβήτη τύπου 2 πάσχει το περίπου το 20% των ατόμων με ηλικία 65 χρονών ή μεγαλύτερη (στη Βόρεια Αμερική). Σε αυτή την περίπτωση εκκρίνεται ινσουλίνη, αλλά εμφανίζεται αναποτελεσματική στην αποκατάσταση των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις ινσουλίνης στην κυκλοφορία είναι επαρκείς (για την καταστολή του σχηματισμού κετόνης)στις περισσότερες περιπτώσεις, γεγονός που προφυλάσσει τους ασθενείς από την εκδήλωση υποτροπιάζουσων κρίσεων διαβητικής κετοξέωσης. Αν και θεραπευτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ινσουλίνη, σε ασθενείς με NIDDM η αποφυγή της κετοξέωσης δεν εξαρτάται από τη συγκεκριμένη αγωγή. Κύριο εύρημα αποτελεί η παρατήρηση ότι αύξηση της τιμής ινσουλίνης πλάσματος δεν συνοδεύεται από την αναμενόμενη αύξηση στη διακίνηση γλυκόζης. Το φαινόμενο αυτό καλείται «αντίσταση στην ινσουλίνη». Σε κάποιους ασθενείς το πρόβλημα εντοπίζεται στους κυτταρικούς υποδοχείς ινσουλίνης, σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται κάποιο πρόβλημα στη διάδοση του (χημικού) σήματος της ινσουλίνης ενώ σε άλλες ο οργανισμός δεν παράγει ινσουλίνη. Η ασθένεια συνήθως ελέγχεται με κατάλληλη διαίτα, σωματική άσκηση και υπογλυκαιμικά σκευάσματα (σουλφοναμίδια, θειαζολιδινοδιόνες, διγουανίδια, αναστολείς Άλφα γλυκοσιδάσης). Στο διαβήτη τύπου 2 τα συμπτώματα εμφανίζονται, συνήθως, σταδιακά και είναι βαθμιαία. Συχνά τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής.http://www.sugarfree.gr/index.php?option=com_content&task=category§ionid=4&id=17&Itemid=60

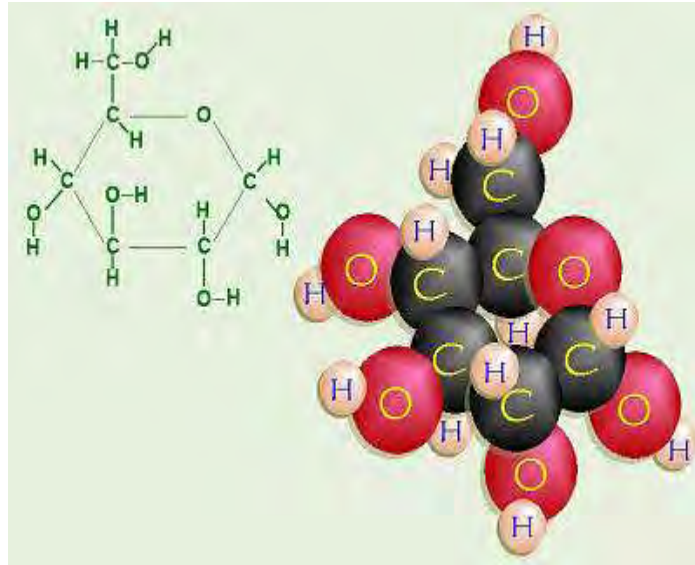
Μερικά από τα συμπτώματα του σακχαρώδη διαβήτη είναι τα εξής:

- Συχνή ούρηση
- Υπερβολική δίψα
- Υπερβολική πείνα
- Ασυνήθιστη απώλεια βάρους
- Αυξημένη κόπωση
- Κνησμός
- Θαμπή όραση

Ωστόσο οι θεραπείες αυτές έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες (Morral 2003). Υπάρχει λοιπόν ένα σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου [Oikonomakos *et al.*, 2001].

2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. [Stryer, 1997].



Εικόνα 5: Δομή δακτυλίου γλυκόζης

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle *et al.*, 2000]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, αφού ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν ως καύσιμο μόνο τη γλυκόζη. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer, 1997]. Εάν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα μειωθεί πολύ, τότε μειώνεται αντίστοιχα και η λειτουργία του εγκεφάλου [Γεωργάτσου, 1989].

Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle *et al.*, 2000].

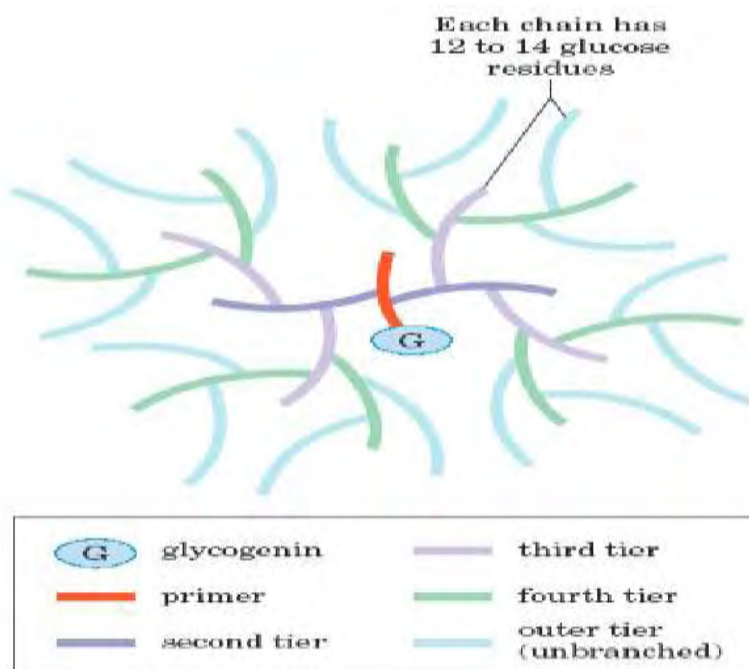
Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί

μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης (McArdle *et al.*, 2000).

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο GP διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη (Martin *et al.*, 1998). Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού (McArdle *et al.*, 2000).

2.2.1 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α -D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις που απαντούν περίπου σε κάθε δέκατο κατάλοιπο σχηματίζονται από α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς.



Εικόνα 6 : Δομή γλυκογόνου.

Το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καύσιμων μορίων για διάφορους λόγους. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση

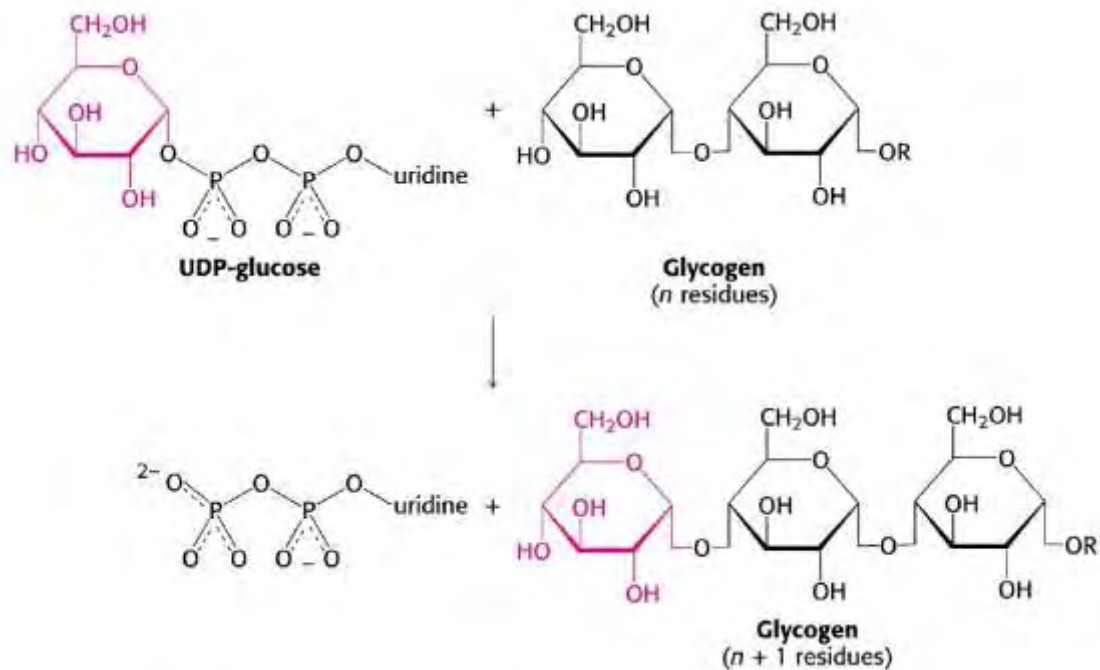
γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι η γλυκόζη ουσιαστικά είναι το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο.

Στο ήπαρ η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως σύνολο. Αντίθετα στους μύς οι διαδικασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο. (Stryer 1997).

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα από τον καταρράκτη της κυκλικής AMP(μονοφωσφορικής αδενοσίνης) που διεγείρεται από μια ορμόνη και δρα μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A. Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης εμποδίζει την σύνθεση του γλυκογόνου ταυτόχρονα με την αποικοδόμηση του.

2.2.2 Σύνθεση γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί ένα μόριο *εκκινητή*, ένα εναρκτήριο μόριο (τουλάχιστον τεσσάρων καταλοίπων) πάνω στο οποίο προστίθενται αλυσίδες ολιγοσακχαριτών με την δράση της GS (συνθάση του γλυκογόνου). Αυτή η εναρκτήρια λειτουργία εξασφαλίζεται από μια πρωτεΐνη (γλυκογονίνη) που περιλαμβάνει έναν ολιγοσακχαρίτη, αποτελούμενο από α-1,4-γλυκόζες, συνδεδεμένο με το φαινολικό άτομο οξυγόνου ενός καταλοίπου τυροσίνης. Αυτός είναι ο λόγος που πάντα όταν απομονώνεται γλυκογόνο αυτό περιέχει και πρωτεΐνες. Η αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου καταλύεται από τη GS σύμφωνα με την παρακάτω πορεία: **UDP-Glc + (Γλυκογόνο)_n ⇌ (Γλυκογόνο)_{n+1} + UDP**



Εικόνα 7 : Συνθετική πορεία του γλυκογόνου

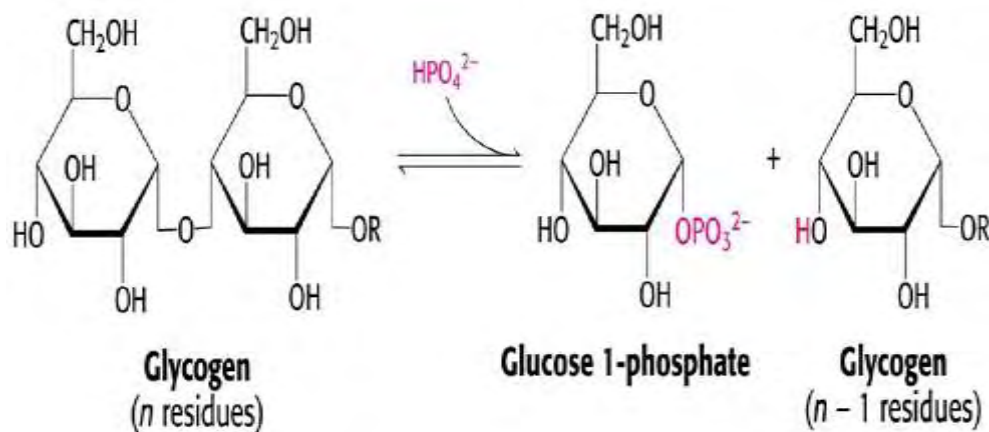
Η GS καταλύει τη μεταφορά της ενεργοποιημένης γλυκοζυλικής μονάδας από την UDP (ουριδινοφωσφορική) γλυκόζη στο υδροξύλιο του C-4 ενός άκρου του γλυκογόνου προς τον σχηματισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4. Κατά την επιμήκυνση, η UDP αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου. (Stryer 1997)

2.2.3 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori στη συνέχεια απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο είναι ένα πάρα πολύ σημαντικό ένζυμο στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori & Cori, 1936]. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού (Pi), προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και

του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [Stryer, 1997].

Γλυκογόνο (n κατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n-1 κατάλοιπα)



Εικόνα 8: Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6,8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3,6. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να καταλύσει την απομάκρυνση μορίων γλυκόζης μέχρι 4 μόρια πριν από τη διακλάδωση. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση.

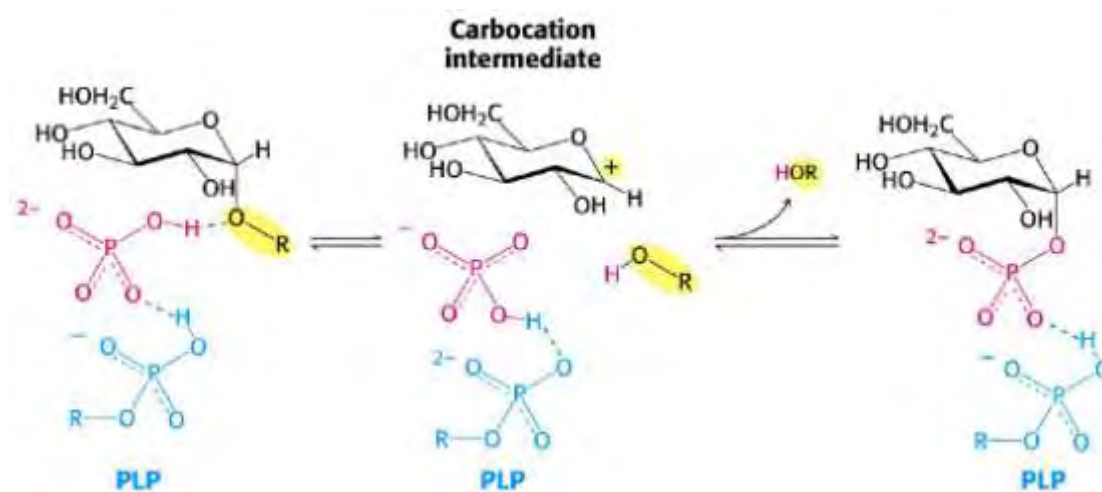
Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer, 1997].

2.2.4 Συμμετοχή φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. (Stryer 1997)

Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατίον, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη [Stryer, 1997].

Ενδιάμεσο καρβοκατίοντος



Εικόνα 9: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{2-} (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζυτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από τη πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (εικόνα 9). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό ανιόν, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη δευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης (Stryer, 1997).

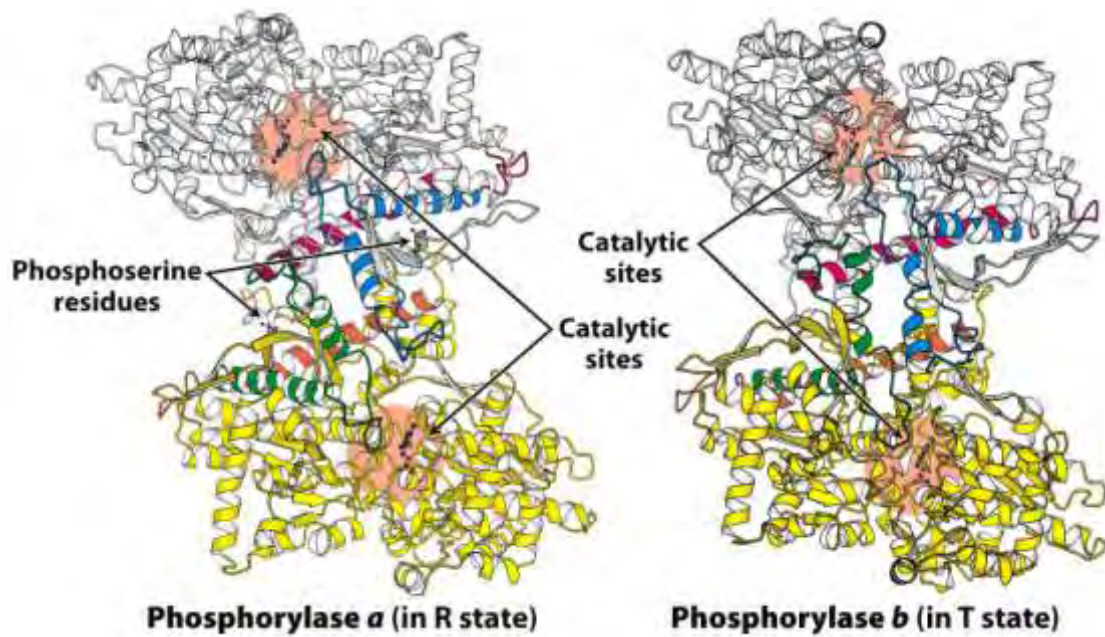


Εικόνα 10: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η φωσφορική πυριδοξάλη (κόκκινο) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης(μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης.

2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1- φωσφορική γλυκόζη. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών στην υπόταξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών και στην υπο-υποτάξη των εξοζυλοτρανσφερασών σύμφωνα με την IBU και IUPAC όσον αφορά την φύση της αντίδρασης που καταλύει και έχει συστηματική ονομασία 1,4-α-D-γλυκο:φωσφορικό α-D γλυκοτρανσφεράση [Barman, T.E. 1969]. Δομικά αποτελεί μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, που αποτελείται από δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kDa και χρησιμοποιεί ως προσθετική ομάδα για τη κατάλυση τη φωσφορική πυριδοξάλη. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου. Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό και στους ιστούς απουσιάζει το ένζυμο υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6- φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση όπως γλυκόζης (Stryer 1997).

Τα τελευταία χρόνια η GP αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για το σχεδιασμό αναστολέων με φαρμακευτικές εφαρμογές στη βελτιστοποίηση του ελέγχου του σακχάρου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Το ένζυμο αυτό εμφανίζεται σε δύο μορφές : την αποφωσφορυλιωμένη μορφή, GPb και στη φωσφορυλιωμένη μορφή, GPa. Σε ξεκούραστους μυς το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργή μορφή του (GPb), που μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε με τη μη ομοιοπολική σύνδεση συνεργιακή σύνδεση του AMP (η του IMP) είτε με ομοιοπολική φωσφορυλίωση στη μορφή GPa. (Oinomakos, 2001)

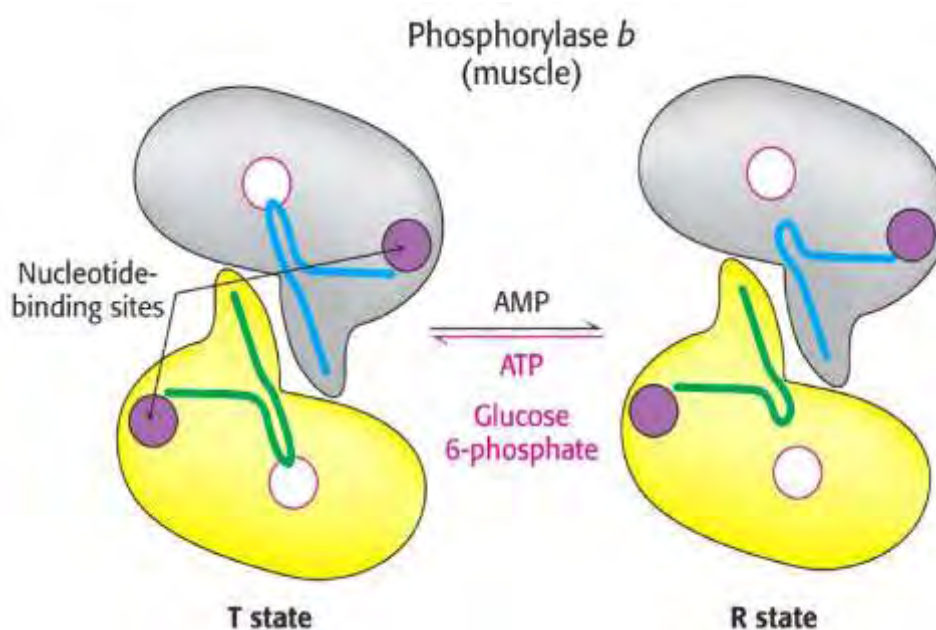


Εικόνα 11: Οι δομές της φωσφορυλάσης α και β. Η φωσφορυλάση α είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή R διαμόρφωση. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση β δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

Φυσιολογικά η δραστηκότητά της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G,PP-G1)υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP). (Rath et al.2000)

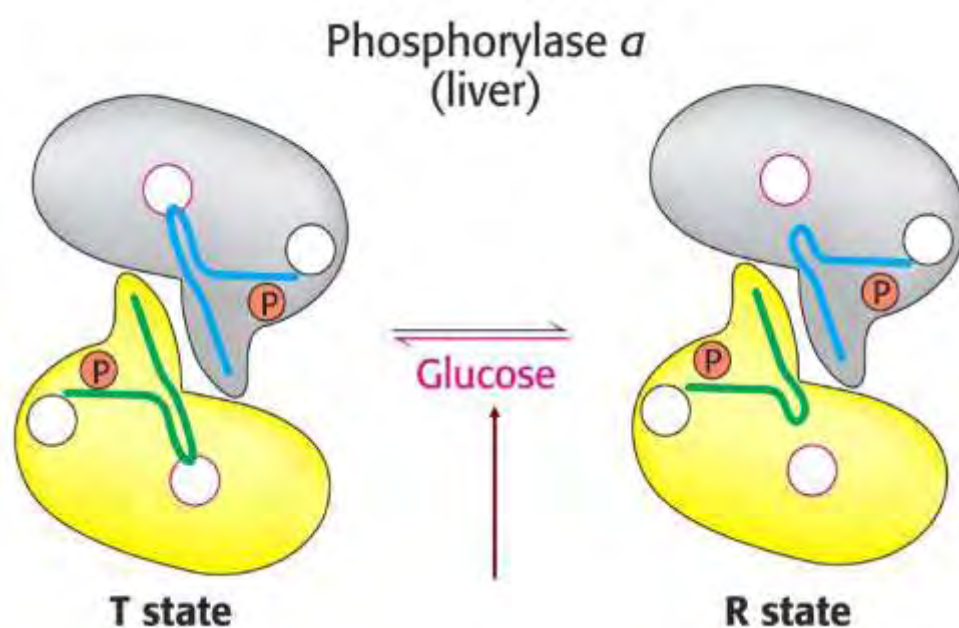
Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση β) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση α) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το

ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη. Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Το ATP δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος το AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. (Stryer 1997). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6- φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.



Εικόνα 12: Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης : Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R. (Stryer 1997) Η ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιοστάση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a, αλλά όχι η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη

ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. (Stryer 1997).



Εικόνα 13: Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης: Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση α μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση T και απενεργοποιεί το ένζυμο. Έτσι το γλυκογόνο δεν κινητοποιείται όταν η γλυκόζη είναι ήδη σε αφθονία

2.3.1 Κρυσταλλική δομή της GP

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a και της GP_b (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 από τους Barford και Johnson (Barford & Johnson, 1989). Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά νερού (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια

διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [Barford & Johnson, 1989].

Κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης (Σχήμα 13) :

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση του διμερούς μορίου της GPb όπου βλέπουμε τις θέσεις του καταλυτικού, του αλοστερικού, του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα και του νέου αλοστερικού κέντρου (CP320626). Ακόμη βλέπουμε τη γλυκόζη, έναν ανταγωνιστικό

αναστολέα του ενζύμου που προάγει τη λιγότερο ενεργή κατάσταση T μέσω σταθεροποίησης της κλειστής θέσης του βρόγχου 280s, να προσδένεται σε αυτή τη θέση. **Oikonomakos N G et al. J. Biol. Chem. 2000** Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å. Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. (Oikonomakos et al., 1992)

2.3.2 Κέντρα σύνδεσης της GP

Η GP έχει έξι κέντρα σύνδεσης:

1) Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b και σε αυτό βρίσκεται η σερίνη 14, η οποία έχει στρατηγική θέση στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Στην GPb, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων. (Stryer, 1997)

2) Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και περίπου 12 Å από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει προσδιοριστεί και στις δυο διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)

Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης) Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, GLC-1-P, Pi, SO_4^{2-}), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων (Oikonomakos *et al.*, 1992).3) Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (1-φωσφορική γλυκόζη, Glc-1-P και ανιόντα φωσφορικών, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο αμινοξικής ακολουθίας 282-285. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση $T \rightarrow R$, ο βρόγχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας (Oikonomakos *et al.*, 1992).

4) Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας (Johnson *et al.*, 1989).

Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης (Oikonomakos *et al.*, 1992).

5) Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδρόφοβο κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (αμινοξέα 13-484) καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (αμινοξέα 485-842). Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως πουρίνες (όπως η αδενίνη και η καφεΐνη), νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινωσησίνη), νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σώματα (όπως η ριβοφλαβίνη) δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP_a και GP_b, όχι όμως και στην ηπατική GP_a, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα (Oikonomakos *et al.*, 2002). Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe285 του βρόγχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου καθώς επίσης και την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP (Oikonomakos *et al.*, 2002).

Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων (Sprang *et al.*, 1982).

6) Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GP_b. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες

αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPa (Oikonomakos *et al.*, 2002).

3 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Καθώς οι ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές για το διαβήτη τύπου 2 δεν είναι ικανοποιητικές, τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εύρεση ενός άλλου δραστικού και ασφαλούς τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην μείωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Καθώς η GP είναι ένα ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση της γλυκόζης, χρησιμοποιείται ως στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP του οργανισμού (ηπατικής, μυϊκής, του εγκεφάλου), μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ.(Oikonomakos *et al.*, 2008). Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιοριστεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1).

Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τα οποία αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002]. Στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP.

Πειραματικό Μέρος

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962) με μικρές μόνο τροποποιήσεις (π.χ. χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [Melpidou & Oikonomakos, 1983].

Υλικά

- 3 κουνέλια
- Απιονισμένο H₂O
- Όξινο ανθρακικό κάλιο, MB. 100.12 (Merck Chemicals, Germany)
- 2-μερκαπτοαιθανόλη, MB. 78.3 (Serva, Heidelberg- Germany)
- EDTA, MB. 372.24 (Panreac, Barcelona-España)

- Οξικό οξύ 99-100%, MB. 60.05 (Chem-Lab, B-8210 Zedelgem)
- β- γλυκερινοφωσφορικό νάτριο 0.005M, MB. 306.12 (Merck KGaA, Germany)
- 5'- φωσφορική αδενοσίνη, MB. 367.2 (Sigma- Aldrich, Steinheim- Germany)
- Τρίς- (υδροξυμέθυλο)- αμινομεθέλιο, MB. 121.1 (Serva, Heidelber, Germany)
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46 (Ferac, Berlin)
- Θεϊκό αμμώνιο, MB. 132.14 (Serva, Heidelber- Germany)
- C₃H₈O₃ - Γλυκερόλη 100% (Charlo Erba Reactifs- SDS)
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης (Serva Heidelberg, Germany) Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na₂CO₃ και 10mM EDTA στους 100°C (30 min) και συνεχείς εκπλύσεις με απεσταγμένο ύδωρ.

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου (50: 50: 1) β- γλυκερινοφωσφορικό νάτριο / 2-μερκαπτοαιθανόλη / EDTA, pH 6.8
- Κεκορεσμένο Διάλυμα KHCO₃
- Διάλυμα 2- μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH 7.0
- Διάλυμα CH₃COOH 1N
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 2M και 0.001M, pH 7.5
- Διάλυμα EDTA 0.1M pH 7.0
- Διάλυμα AMP 0.1M pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1M pH 7.0
- Διάλυμα (NH₄)₂SO₂ 90% κορεσμού w/v

Όργανα

- Χειροκίνητη κρεατομηχανή
- Αναλυτικός ζυγός (Kern, Balingen- Germany)
- Αντλία Κενού Buchner (Pall, Live Sciences)
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή Vortex (IKA[®] Works, INC)
- Φασματοφωτόμετρο (Genesys 10uv – Spectronic Unicam)
- Οι φυγοκεντρήσεις μέχρι 45000 g έγιναν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Sorvall, RC5-C (Sorvall, USA) χρησιμοποιώντας την κεφαλή SS-34 (DuPont, Wilmington-USA).
- Η ρύθμιση του pH των διαλυμάτων έγινε με πεχάμετρο Metrohm 744 (Metrohm, Switzerland).
- Για την ογκομέτρηση μικρών όγκων κατά την διεξαγωγή των κινητικών πειραμάτων και των κρυσταλλώσεων χρησιμοποιήθηκαν αυτόματες πιπέτες Gilson P1000-P10 (Gilson, France).

Διαδικασία

Βήμα 1. Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μύς από τρία κουνέλια. Οι μύς αλέθονται με χειροκίνητη μηχανή παραγωγής κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο νερό εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο νερού αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο νερού αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2. Όξινη καταβύθιση άλλων πρωτεϊνών.

Το pH του ψυχρού εκχυλίσματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με την προσθήκη CH₃COOH 1N. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min, όπου και παρατηρείται η σταδιακή αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος (κατακρήμνιση πρωτεϊνών). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 30 min σε θερμοκρασία 0-4°C, το υπερκείμενο υγρό διηθείται με τη βοήθεια αντλίας κενού Buchner για την απομάκρυνση υπολειμμάτων και γίνεται ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο διάλυμα KHCO₃.

Βήμα 3. Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταβυθίζεται σε 41% κορεσμό θειικού αμμωνίου με την προσθήκη διαλύματος θειικού αμμωνίου σε 90% κορεσμό όγκου ίσου με 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το μίγμα αφήνεται στους 4 °C για 24 ώρες. Μετά από την προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου (με χρήση αντλίας), το ίζημα παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση στις 5500 rpm για 30min στους 4°C και διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου νερού και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH.

Μετά την διαπίδυση του πρωτεϊνικού διαλύματος ακολουθεί διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 5500 rpm για 30min στους 4 °C και στη συνέχεια προστίθενται τα ακόλουθα:

α) κατάλληλος όγκος ουδέτερου διαλύματος β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M έτσι ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 3×10^{-2} M

β) ουδέτερο διάλυμα EDTA 0.1M

γ) κατάλληλη ποσότητα αλκαλικού διαλύματος Tris 2.0M για τη ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται.

Βήμα 5. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση.

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100 mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση προάγοντας τον τετραμερισμό της GP. Το μίγμα αφήνεται στους 4°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (50 mM β-GP, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στον ψυκτικό θάλαμο (4°C) για 3-4 ώρες. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6. Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου.

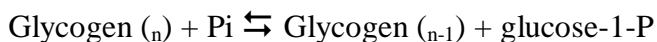
Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης b γλυκογόνου, μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή, διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης 100%. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20°C.

2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen**_(n), προς **Glycogen** _(n-1) και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, δηλαδή μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα ένζυμου περιεκτικότητας ~500μg/mL. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μg /mL, γλυκογόνο 0.2 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για α-D-Glc-1-P 2.0 mM με προσθήκη 200 μL υποστρώματος α-D-Glc-1-P 9.0 mM, 20μL AMP 45 mM και 500 μL H₂O (κατάλληλο για τέσσερα δείγματα).

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους 30 °C επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί 5 λεπτά. Μετά την επώαση, 180 μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 5.0 μg ένζυμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D-Glc-1-P 2.0 mM, 50 mM υδροχλωρικής τριαιθανολαμίνης, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30 °C και το pH 6.8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1.0% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D-Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της παρουσίας φωσφορικών).

2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α -D- Glc-1-P).

Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μ g ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α -D- Glc-1-P 1.0 έως 20 mM, με προσθήκη 200 μ L από το αντίστοιχο υπόστρωμα α -D- Glc-1-P, 20 μ L AMP 45 mM και 500 μ L H₂O.

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση στους 30 °C επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα επί 5 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180 μ L ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0 μ g ένζυμο/mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.1% w/v, υπόστρωμα α -D- Glc-1-P 2.0-20 mM, ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM ιμιδαζολίου, 1 mM EDTA, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1,2,3,4) λαμβάνονται δείγματα των 200 μ L από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μ L SDS 1.0% w/v.

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α -D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

2.3 Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής (Segel, 1975).

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή (fully competitive inhibition), αφού η σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και κατ' επέκταση τη δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου «μιμούμενος» το υπόστρωμα και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Συνήθως οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Σκοπός του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%. Αυτή η συγκέντρωση ορίζεται ως IC₅₀. Έτσι, η σταθερά IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC₅₀ και για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (1-φωσφορικής γλυκόζης).

Υλικά :

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α -D- Glc-1-P) 18mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β -φωσφογλυκερόλης

(β- GP), 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)

- Γλυκογόνο 1 % (w/v)

- Διάλυμα SDS 1%

Ιμιδαζόλιο

χλωριούχο κάλιο, KCl, MB 74,56 g/mol (SIGMA) η μεγάλη συγκέντρωση του KCl είναι απαραίτητη για τη διατήρηση σταθερής ιοντικής ισχύς στα πειράματα

EDTA, $C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$, MB 372,5 g/mol (SERVA)

Διθειοθρεϊτόλη, DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$, MB 154,25 g/mol (SIGMA), η DTT όπως και η μερκαπτοαιθανόλη δρα ως αναγωγικό μέσο για την αποφυγή φαινομένων όπως η μερική οξείδωση του ενζύμου ή μικροετερογένεια κατά την κρυστάλλωση.

- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8

- Διάλυμα του αναστολέα

Όργανα:

- Υδατόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία στους 30° C.)

- Φασματοφωτόμετρο

- Δοκιμαστικούς σωλήνες

- Ζυγός

- Πιπέτες

- Συσκευή vortex

- pHμετρο

- Χρονόμετρο

Πορεία :

2.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10 μl και το αραιώνουμε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου 50 mM 2-μερκαπτοαιθανολης, 1mM EDTA. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm.

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 25μg/mL GPb, γλυκογόνο 5% w/v, και ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου 50 mM 2-μερκαπτοαιθανολης, 1mM EDTA, έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg/ mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2 % w/v και υπόστρωμα α-D-Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα μεταβαλλόμενης. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30° C.

2.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος

Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P

Από το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4 mM), DTT (4 mM) αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα Glc-1-P (90mM), ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και με pH 6.8.

Εν συνεχεία, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και pH 6.8 με αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4 mM), DTT (4 mM).

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της Glc-1-P προκύπτουν με αραιώσεις του διαλύματος Glc-1-P 90mM με το ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM). Έτσι προκύπτουν συνολικά τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 67.5mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 45mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 40.5mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 27mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 18mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 9mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί υδρόλυση της Glc-1-P.

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC₅₀, σε σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P 18mM και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 4 mM και της AMP 1mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL. Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P	200 μL	200 MI
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	X μL
H ₂ O	502 μL	720-(200+18+X) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL

Τα διαλύματα υποστρώματος τοποθετούνται πριν την εκτέλεση του πειράματος στο υδατόλουτρο ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα.

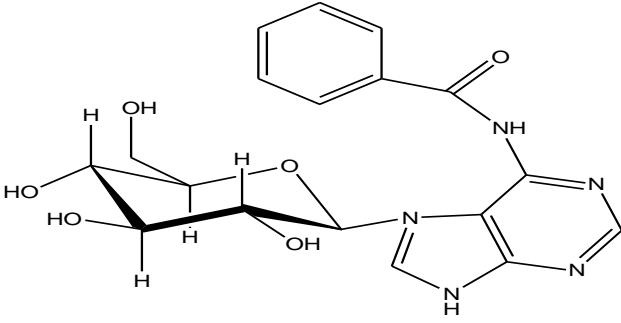
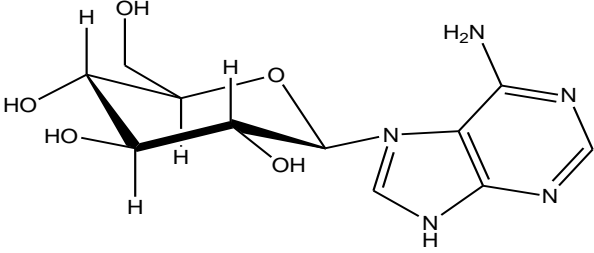
2.3.3 Εκτέλεση του πειράματος

Μετά την επώαση, του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180 μl από το ενζυμικό μίγμα στον χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 720 μL , ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολούθως, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1, 2, 3, και 4 min), λαμβάνονται 200 μL και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1% w/v. Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού παρουσία του απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μια διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου (βλ. Πειραματικό μέρος §2.4) σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των $\mu\text{mol Pi}$ που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit (βλ. Πειραματικό μέρος §2.6), προκειμένου να προσδιοριστεί η IC_{50} . Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

Ακολουθεί η λίστα με τους αναστολείς (με την ονομασία DK) που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και περιγραφή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν των για τον προσδιορισμό της IC_{50} . Οι συνθήκες κάθε σειράς πειραμάτων ήταν :

- $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$: 4mM
- AMP: 1mM
- Γλυκογόνο: 0,2% w/v

Όνομα	Ένωση	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν
DK27		50μM, 150μM, 400μM, 600μM, 900μM
DK28		200μM, 400μM, 900μM, 1389μM

Πίνακας 1 : Οι αναστολείς και συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στα κινητικά πειράματα

2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925). **Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]**

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ορθοφωσφορικά ιόντα πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4 μM προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Υλικά:

- Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με αμιζών HCl 1N.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N. Ανάμιξη 4:1 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος.

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Πορεία:

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5 mL από το αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15 min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

2.5 Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC₅₀ βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά :

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

- Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους. Επίσης, παρασκευάζεται γνωστό πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$.

2.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) αποτελεί έκφραση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου και ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή $1\mu\text{mol}$ υποστρώματος ή παραγωγή $1\mu\text{mol}$ προϊόντος ανά λεπτό κάτω από ορισμένες συνθήκες. Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow, 1992) εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα ‘simple weighting’) (Leatherbarrow, 1990). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

$$v = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{\text{όριο}}{\text{όριο} - \mu\text{molPi}} \right) \text{όριο}/\text{mg}_{\text{ενζύμου}}$$

όπου k : είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης

t : ο χρόνος της αντίδρασης

όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της Glc-1-P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της Glc-1-P στην ισορροπία της αντίδρασης (78%).

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{\max} και K_m και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$



Όπου : v : Η ταχύτητα της καταλύομενης αντίδρασης.

V_{\max} : Η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

$[S]$: Η συγκέντρωση του υποστρώματος.

E : Το ένζυμο

S : Το υπόστρωμα

ES : Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

P : Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $v = V_{\max}[S]/K_m + [S]$ (οπού v : ταχύτητα, V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα, $[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος, K_m : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{\max} .

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηρότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηρότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα

εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{\mathbf{s.a.}_{\text{control}} - \mathbf{s.a.}_i}{\mathbf{s.a.}_{\text{control}}} \times 100\%$$

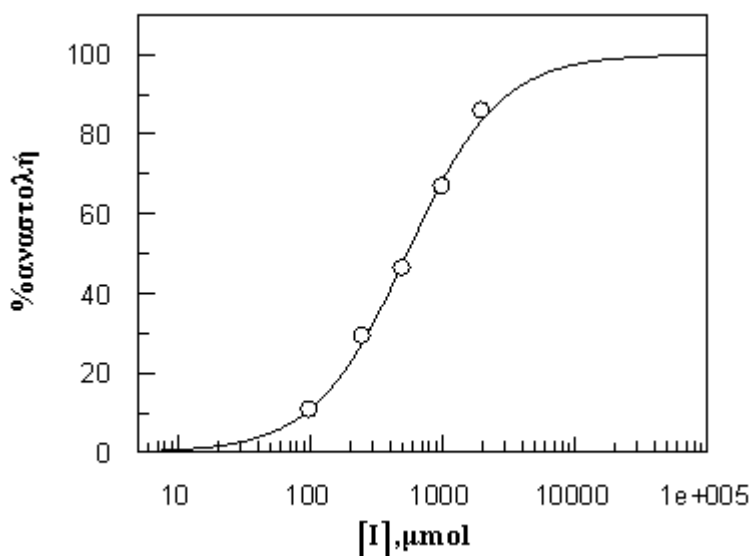
Όπου: $\mathbf{s.a.}_{\text{control}}$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

$\mathbf{s.a.}_i$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC_{50} θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα $\% \text{αναστολή} = f([I])$. Από την τιμή της IC_{50} προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος ως προς το οποίο εξετάζεται η GPb, δηλαδή η συγκέντρωση της Glc-1-P



Σχήμα 3. Διάγραμμα από όπου εξάγεται ότι η IC_{50} του αναστολέα

Βλέπουμε ότι όσο πιο μικρή είναι η τιμή της $[S]$ τόσο τείνουν να ταυτιστούν οι τιμές της IC_{50} και K_m , δηλαδή $\lim_{[S] \rightarrow 0} IC_{50} = K_i$. Γι' αυτό το λόγο επιλέγονται οι πιο μικρές συγκεντρώσεις Glc1-P, οι οποίες μπορούν να μετρηθούν, για τον προσδιορισμό της IC_{50} (συνήθως $[Glc-1-P]$ στην αντίδραση 2mM).

3. Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση του.

Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM BES/NaOH (pH 6.7) για 16 h. Ο λόγος των απορροφήσεων A_{260}/A_{280} , που αποτελεί κριτήριο ύπαρξης νουκλεοτιδίων, είναι συνήθως 0.62 κατάλληλος για την καλύτερη διατήρηση του ενζύμου και της ενζυμικής δραστηριότητας. Στην τιμή αυτή ο γραμμομοριακός λόγος ενζύμου: AMP είναι περίπου 1:1. Για την απομάκρυνση του AMP (που είναι απαραίτητη για την κρυστάλλωση) το ένζυμο κατεργάζεται με ενεργό ζωικό άνθρακα (Norit A) σε αναλογία ενζύμου:ζωικός άνθρακας περίπου 1:1 (κ.β.) (Melpidou & Oikonomakos, 1983). Λόγος των απορροφήσεων A_{260}/A_{280} 0.53-0.54 θεωρείται ενδεικτικός της απομάκρυνσης του AMP (Kastenschmidt et al., 1968).

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίδεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch [Oikonomakos et al, 1985]. Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου P43212) εντός γυάλινων σωλήνων.

ΥΛΙΚΑ:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM BES/NaOH (σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-Αμινοαιθανίου), pH 6.7, 1mM EDTA 2% w/v NaN₃, 2 mM DTT
- Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα IMP 200mM pH 7.0 (5'- φωσφορική ινোসίνη (με τα Νατρίου άλας), C₁₀H₁₁N₄O₈PN_a2, MB 392.17 g/mol (SIGMA))
- Πυρήνες κρυστάλλωσης
- Εναιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα BES/NaOH pH 6.7.
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 mm και μήκους 3 cm

ΟΡΓΑΝΑ:- Φασματοφωτόμετρο UV

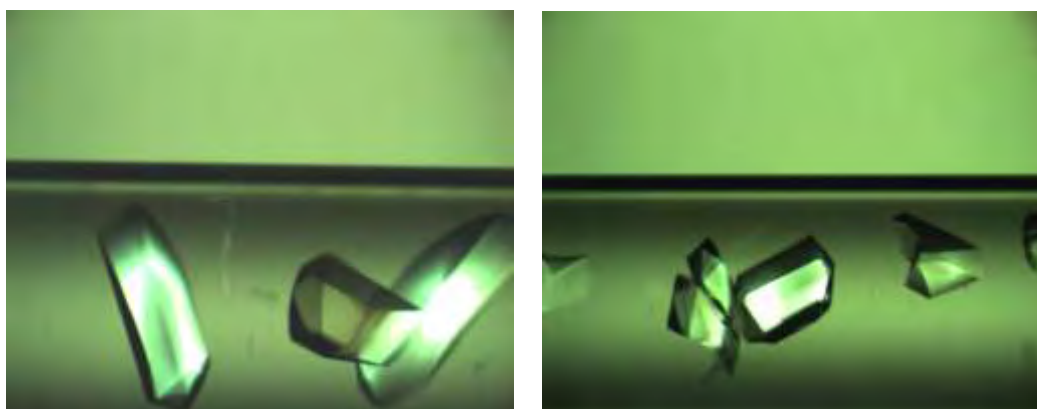
Πορεία

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου P4₃2₁2) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ($A_{260}/A_{280} = 0.53-0.54$). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 1mM IMP, 10 mM BES/NaOH (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN₃ στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσης (Oikonomakos *et al.*, 1985). Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι $a=b=128.6 \text{ \AA}$, $c=116.1 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως το μέγεθος τους είναι 0.2-0.5 mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλαση ακτινών

X. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι: $I = I_0 * e^{-\mu t}$



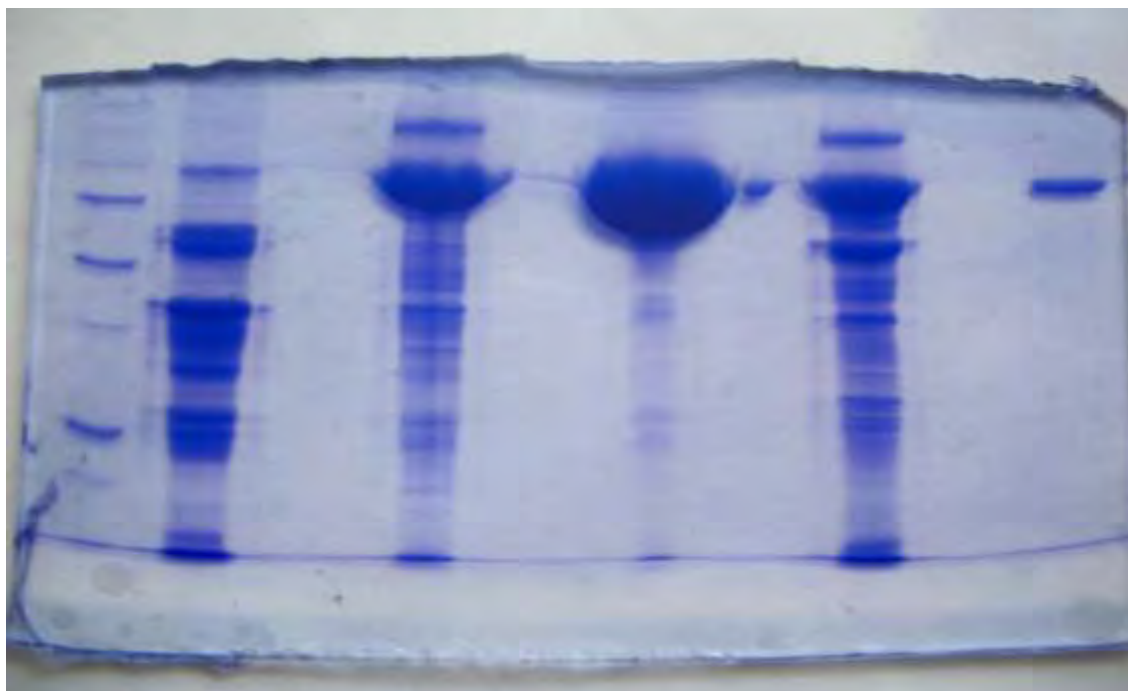
Εικόνα 15: Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της GPb στην T διαμόρφωση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 1).

Μάρτυρας Διαδρομή 1 Διαδρομή 2 Διαδρομή 3 Διαδρομή 4 Διαδρομή 5



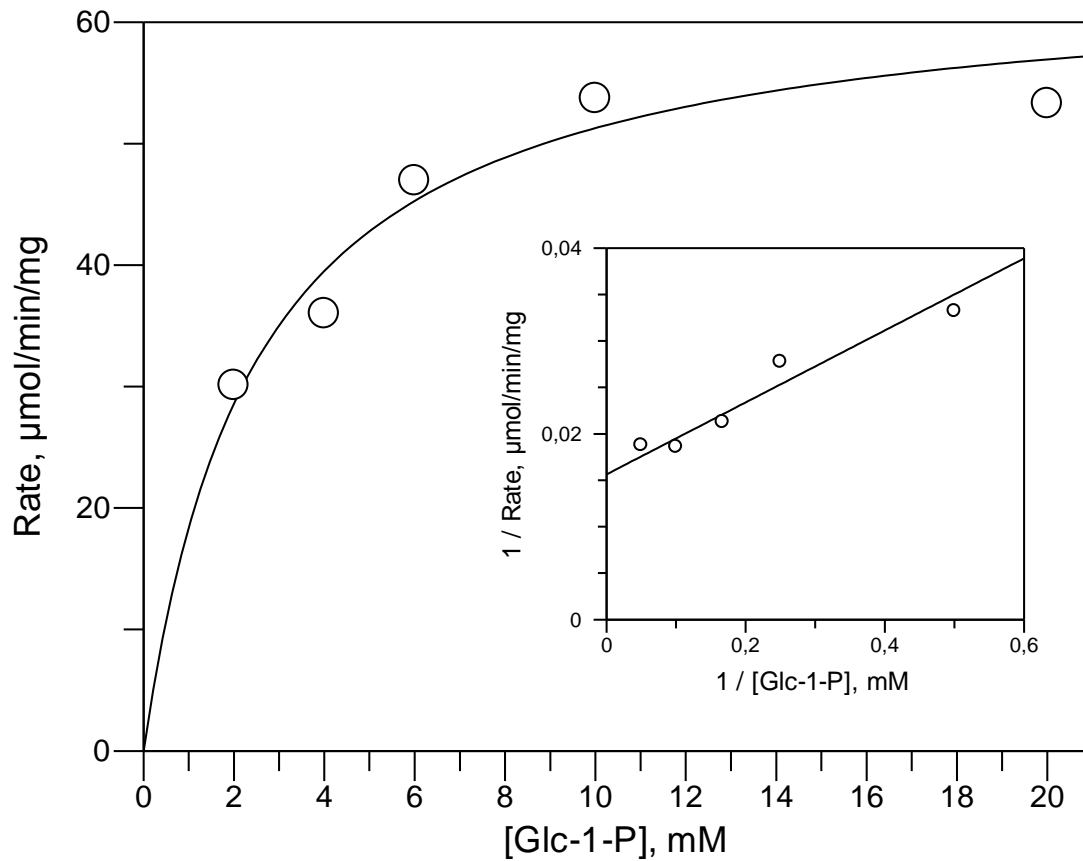
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά και την τελευταία ανακρυστάλλωση, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5 mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m . (βλ. Πειραματικό μέρος, §2.2)

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=2.48 \pm 0.84$ mM και $V_{max}=63.99 \pm 6.17$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Στο σχήμα παρουσιάζεται η καμπύλη της ειδικής δραστηριότητας, (specific activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Glc-1-P).

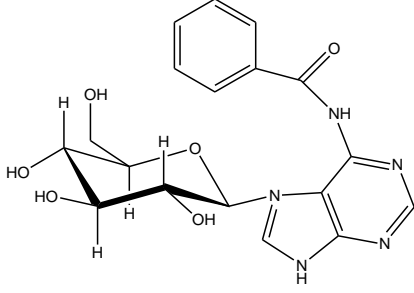
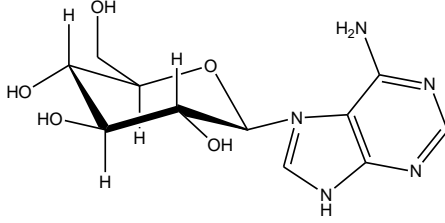


Εικόνα 17: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου β σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο παρουσιάζεται το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk από το οποίο υπολογίζονται οι σταθερές K_m και V_{max} .

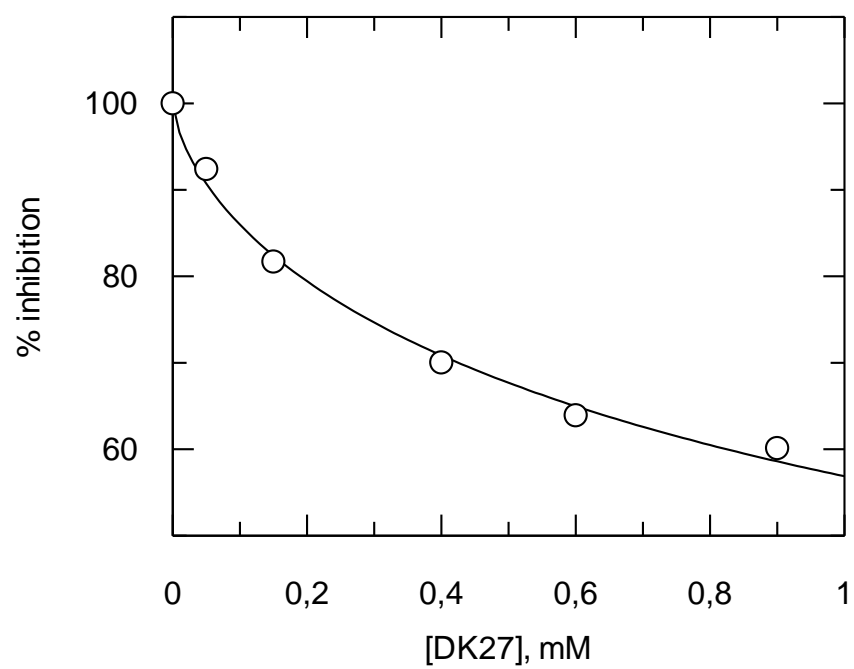
2.2 Κινητική μελέτη ενώσεων DK

Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου μελετήθηκαν οι ενώσεις DK27 (βενζοαδενίνη) και DK28 (αδενίνη) ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα

αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit (Leatherberrow,1997)

Όνομα	Ένωση	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	IC50
DK27		50μM, 150μM, 400μM, 600μM, 900μM	1.51 ± 0.14 mM
DK28		200μM, 400μM, 900μM, 1389μM	2.53 ± 0.52 mM

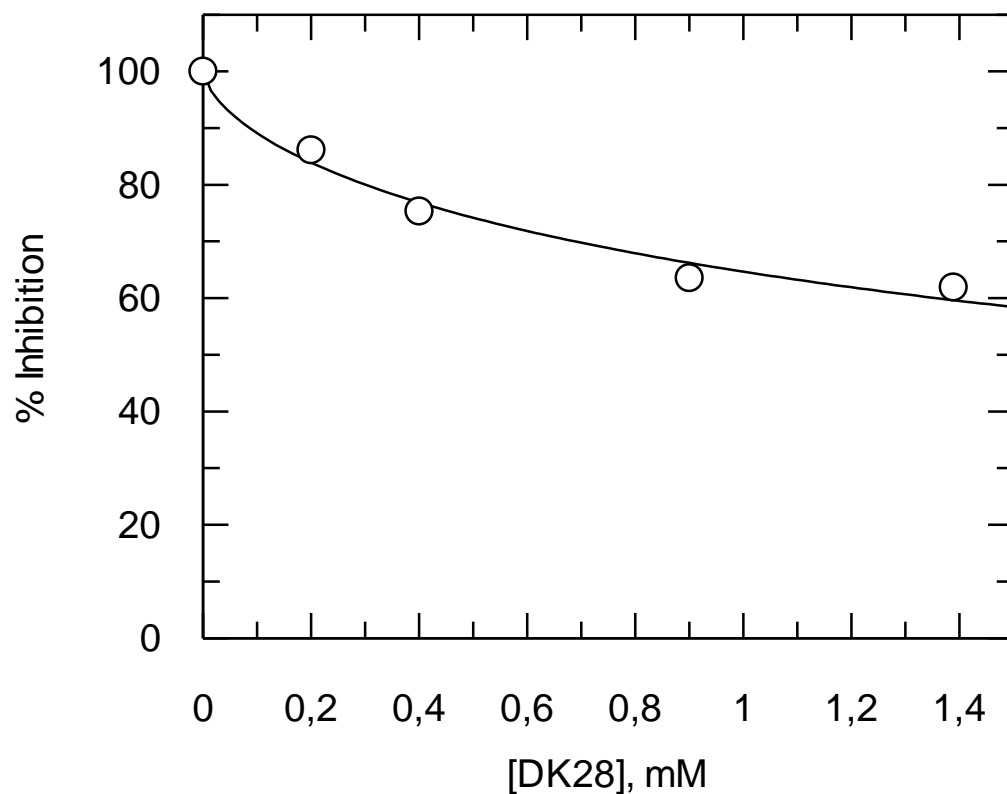
•DK27



$IC_{50} = 1.51 \pm 0.14 \text{ mM}$

Εικόνα 18: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηρότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK27 και υπολογισμός της IC_{50}

•DK28



$IC_{50} = 2.53 \pm 0.52$ mM

Εικόνα 19: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηρότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK28 και υπολογισμός της IC_{50} .

Συμπερασματικά, φαίνεται πως ο υποκαταστάτης με βενζοαδενίνη είναι σχετικά ισχυρότερος αναστολέας από εκείνον με μόνο την αδενίνη. Εντούτοις και οι δύο αναστολείς εμφανίζουν ανασταλτική δράση ανάλογη με εκείνη της γλυκόζης και άρα φαίνεται πως η προσθήκη μεγάλων υποκαστατών όπως η αδενίνη ή η βενζοαδενίνη στη θέση 1 του γλυκοπυρανοζιλικού δακτυλίου δεν οδηγούν σε ενώσεις με ισχυρότερη ανασταλτική δράση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ζωγράφος Σ. Ε. (2000). Κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες των ενεργών και ανενεργών διαμορφώσεων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης: Δομικός και καταλυτικός ρόλος του συνενζύμου 5-φωσφορικής πυριδοξάλης, αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου και μοριακή αναγνώριση. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- McMurry J. (2001). Οργανική Χημεία, Τόμοι I & II, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261
- Ρακιντζής Θ. Ν., 1994, Φυσικοχημεία, Έκδοση 3^η, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
- Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4^η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- Stryer L., 1997, Βιοχημεία, Τόμος I, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Τσαγκάρης Γ., 1999, Εργαστηριακές ασκήσεις φυσικοχημείας, Σειρά 1, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- Tsirkone G.V, Tsoukala E. , Lamprakis C. , Manta S. , Hayes M. J., Skamnaki T. V., Drakou C., Zographos E. S., Komiotis D, Leonidas D.D., 2010, 1-(3-Deoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3413–3425.
- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. 2008, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983
- Oikonomakos, N.G., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E. and Johnson, L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* 275, 34566-34573.

- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. and Johnson, L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 8, 575-584.
- Oikonomakos, N.G. 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586
- Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P., 2002, The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2008, 9, 379.
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., 1963, Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329.
- Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., 1965, On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.
- Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.
- Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., 1990, Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757.
- McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος I, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. X.
- McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.